



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**Evaluación de la p27 del Virus de Leucemia Viral Felina (FeLV) en una prueba de ELISA comercial a partir de plasma sanguíneo**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**Lucía Karina Ortiz Fragoso**

**ASESOR**

**Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez**

**COASESOR**

**Dr. Hugo Ramírez Álvarez**

**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO ,2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Evaluación de la p27 del Virus de Leucemia Viral Felina (FeLV) en una prueba de ELISA comercial a partir de plasma sanguíneo.

Que presenta el pasante: LUCIA KARINA ORTIZ FRAGOSO  
Con número de cuenta: 30652535-7 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de marzo de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
<b>VOCAL</b>	M.P.A. María Guadalupe Mondragón Olvera	
<b>SECRETARIO</b>	M.V.Z. Alma Noemí Montes De Oca Chávez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en M.V.Z. Rosario Arvizu Venegas	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dr. Alejandro Vargas Ruiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente trabajo se realizó con el apoyo de los siguientes proyectos:

- ❖ PAPIIT IT201418: Diseño y análisis de péptidos sintéticos del virus de leucemia viral felina (FeLV) para detectar anticuerpos en plasma sanguíneo mediante una ELISA indirecta (ELISAI).
- ❖ PIAP11611: Inmunología y diagnóstico de enfermedades retrovirales en felinos.

## **DEDICATORIA**

A todos los miembros del laboratorio de virología, genética y biología molecular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán , en especial al Doctor Humberto Alejandro Martínez Rodríguez.

A los gatos participantes en este estudio.

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a todas las personas que fueron y son parte de mi vida, ya que en mí llevo una parte de ustedes*

Es difícil agradecer a todas las personas que han estado presentes a lo largo de la serie de eventos que me han llevado a estar aquí y concluir con este trabajo la licenciatura en Medicina Veterinaria, gracias a todos.

Gracias a mi mamá por todo lo que me ha enseñado, a ser perseverante, responsable, comprometida y no tomar el camino fácil, lo que soy hoy te lo debo a ti mamá.

Gracias a mi papá por su apoyo incondicional y paciencia que me brindó para concluir mis estudios universitarios después de tanta indecisión .

Michel, gracias por estar, por todo lo que me has dado, por tu compañía y apoyo en la realización de este trabajo, en verdad gracias y particularmente por tu ayuda a resolver las dificultades de este trabajo siempre.

A mi mejor amiga Lilian por ser siempre un apoyo en todas las áreas de mi vida durante toda la licenciatura y en especial al realizar este trabajo, gracias por darme ánimos y creer en mí cuando sentí que no lo lograría, tu amistad es invaluable,

Doctor Humberto gracias por la paciencia, por creer en mí y por la confianza para realizar este trabajo. Usted también es mi profesor favorito.

Dra. Martha, aunque nos vimos poco usted fue parte importante para que este trabajo se realizara, gracias por sus conocimientos, ayuda y regaños que nos ayudaron a seguir adelante.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Etiología.....	2
1.2 Epidemiología.....	5
1.3 Patogenia.....	6
1.4 Etapas de infección.....	7
1.5 Signos Clínicos.....	9
1.6 Alteraciones en el análisis clínico.....	12
1.7 Respuesta Inmune contra el FeLV.....	13
1.8 Diagnóstico.....	14
1.8.1 Inmunoensayo de flujo lateral.....	15
1.8.2 Inmunofluorescencia.....	16
1.8.3 ELISA.....	16
1.8.4 Aislamiento Viral.....	17
1.8.5 PCR.....	18
1.9 Manejo .....	19
1.10 Tratamiento.....	20
1.11 Prevención.....	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVO GENERAL.....	24
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
7. RESULTADOS.....	28
8. DISCUSIÓN .....	31
9. CONCLUSIONES.....	35
10. BIBLIOGRAFÍA.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación gráfica del virus de leucemia felina y productos de sus genes.....	2
Figura 2. Patogenia y etapas de infección del FeLV .....	8
Figura 3. Fotografía de los resultados obtenidos en la prueba de ELISA.....	28

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de los subtipos del FeLV.....	4
Cuadro 2. Estadios de la patogenia del FeLV y resultados de diferentes pruebas de detección por etapa.....	6
Cuadro 3. Características de los Kits comerciales utilizados para el diagnóstico del FeLV.....	15
Cuadro 4. Características de los Kits comerciales de ELISA utilizados para el diagnóstico del FeLV.....	17
Cuadro 5. Interpretación de diferentes resultados obtenidos en ELISA y PCR para la detección del FeLV.....	19
Cuadro 6. Diferentes tipos de vacunas comerciales utilizadas en México.....	22
Cuadro 7. Resultados obtenidos en la detección del FeLV con ELISA, PCR e Inmunoensayo de flujo lateral .....	29
Cuadro 8. Muestras agrupadas según su estatus clínico considerando el resultado de las pruebas de ELISA, PCR e inmunoensayo de flujo lateral.....	30
Cuadro 9. Clasificación del tipo de infección del FeLV según diferentes referencias bibliográficas.....	33



## RESUMEN

El Virus de la Leucemia Viral Felina (FeLV) pertenece a la familia *Retroviridae*, es un virus que afecta a felinos domésticos de todo el mundo y esporádicamente a felinos salvajes. Se trata de una infección persistente y se acompaña de alteraciones o desequilibrios en el sistema inmune. Los signos clínicos asociados al FeLV son muy variables, la inmunosupresión predispone a los gatos a infecciones secundarias.

En el presente estudio se realizaron pruebas de ELISA con el Kit comercial DRG® EIA-2469, a una población de 89 plasmas pertenecientes a un banco de muestras remitidas al laboratorio de virología de la FES-Cuautitlán UNAM.

Un grupo de muestras sospechosas se evaluaron usando el mismo antígeno de la proteína p27 del FeLV utilizando un kit de inmunoensayo de flujo lateral del mismo fabricante.

Comparando los resultados de las pruebas realizadas en este trabajo con los datos diagnósticos previamente disponibles de las muestras se determinó que el 6% de la población de gatos estudiados son virémicos persistentes, el 61 % son portadores latentes, el 23 % no presentan la infección y el 10% son atípicos.

La prueba de inmunoensayo de flujo lateral nos demostró en este estudio ser una opción práctica disponible para realizarse en el ámbito de la clínica.

Las pruebas de PCR previamente realizadas permitieron correlacionar los datos, con lo cual se logró asignar su estatus clínico a cada animal.

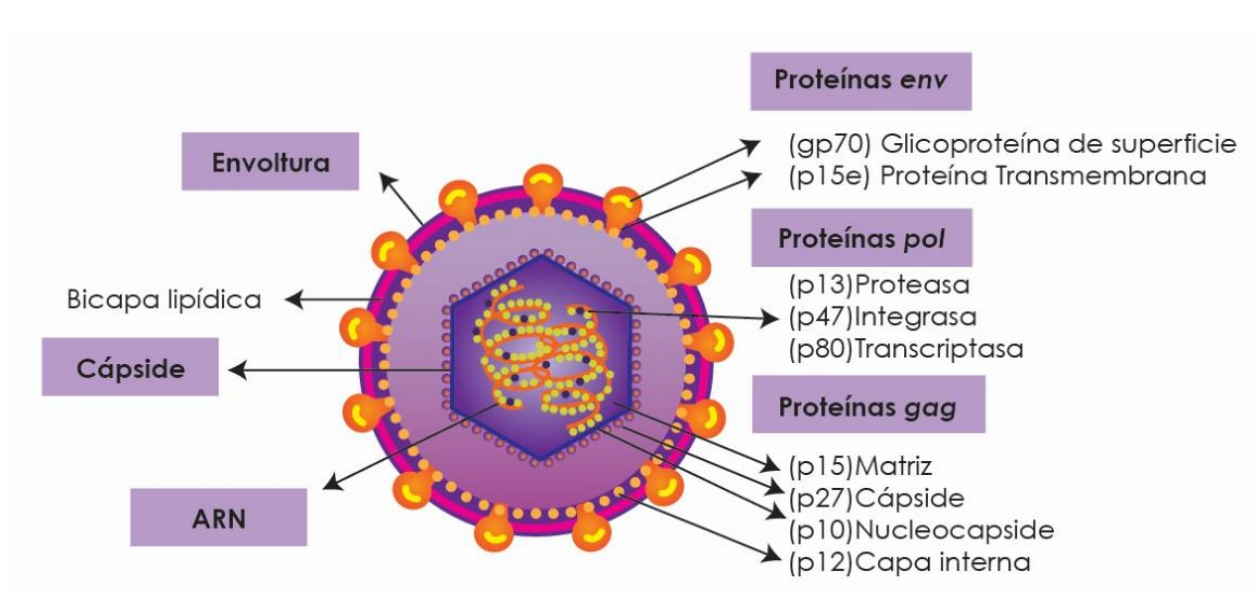
## INTRODUCCIÓN

### 1.1 ETIOLOGÍA

El Virus de la Leucemia Viral Felina (FeLV) pertenece a la familia *Retroviridae*, a la subfamilia *orthoretrovirinae* y al género *gammaretrovirus*<sup>1,2</sup>.

Este virus recibe el término retro, que significa inverso debido a la enzima transcriptasa reversa que es un ADN polimerasa dependiente de ARN, lo cual permite que el virus genere copias ADN a partir de su genoma ARN, formando un provirus cuando se integra al ADN celular. Durante la mitosis celular las células hijas heredan el provirus generando que el gato pueda permanecer infectado durante toda su vida<sup>3,2,4</sup>.

El virus posee protuberancias en forma de espigas que emergen de su envoltura y su estructura consta de una nucleocápside de forma icosaédrica, encargada de proteger el material genético, que corresponde a una sola hebra de ácido ribonucleico (ARN) (figura 1)<sup>3,5</sup>.



**Figura 1.-** Representación gráfica del virus de leucemia felina y productos de sus genes<sup>6</sup>.

El genoma viral codifica los genes principales *gag* (antígenos específicos de grupo), *pol* (transcriptasa reversa) y *env* (envoltura)<sup>3,4</sup>.

El gen *gag* codifica las proteínas estructurales internas de la nucleocápside, conformada por tres proteínas; p27 = proteína de cápside, p10 = proteína de nucleocápside y p15C = proteína de matriz (el valor numérico otorgado a las proteínas se refiere a su peso molecular).

Una de las proteínas *gag*, la p27 es muy abundante en el plasma de gatos infectados y es la base de las pruebas más comunes para realizar el diagnóstico<sup>5,2,4</sup>.

El gen *pol* codifica para la transcriptasa reversa, responsable de copiar el ARN viral en ADN complementario, para integrarlo posteriormente utilizando la proteína viral integrasa.

El gen *env* codifica los diferentes componentes de la envoltura. La glicoproteína gp70 define el subgrupo viral y está implicada en la inducción de inmunidad específica. La proteína p15e se comporta como una proteína transmembranal cuya presencia interfiere con la respuesta inmune<sup>6,2</sup>.

Con base en el antígeno de la glicoproteína 70<sup>7</sup> el FeLV se ha clasificado en cuatro subtipos<sup>2</sup>: A, B, C y T, definidos por su tropismo celular y su diferente patogenicidad<sup>8</sup>. El cuarto subgrupo, T, es el que está relacionado con la infección de los linfocitos T y el subgrupo A, es el único contagioso de gato a gato en estado natural (cuadro 1)<sup>9</sup>.

**Cuadro 1.** Características de los subtipos del FeLV.

Subtipos de Virus	Características	Enfermedad Relacionada
<b>A</b>	100% de los gatos viremicos	Neoplasia hematopoyética
<b>B</b>	Recombinación con subgrupo A. Alrededor del 50% de gatos con enfermedad neoplásica.	Solo no es patógeno, a menos que se encuentre en combinación con el subtipo A
<b>C</b>	Mutación en env del subtipo A. Aislado rara vez	Anemia no regenerativa
<b>T</b>	Marcado carácter T-Linfotrópico	Induce inmunosupresión grave

10

Los felinos tienen en su genoma algunos elementos virales endógenos conocidos como "retrovirus endógenos", los cuales son fragmentos de retrovirus ancestrales que se han integrado y han permanecido en el ADN genómico de su especie huésped durante millones de años sin producir partículas virales infecciosas <sup>2,10</sup>.

## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Es un virus que afecta a felinos domésticos de todo el mundo y esporádicamente a felinos salvajes. Parece ser específico de especie y no afecta a humanos o perros<sup>1,11,12</sup>.

La forma más común de contagio es la transmisión horizontal, por el contacto prolongado con saliva y secreciones nasales de gatos infectados al acicalarse, compartir el agua y comida <sup>13</sup>, y por consumo de leche de las crías de una gata infectada, aunque también han sido identificadas otras rutas de infección como la transplacentaria<sup>2, 11, 14</sup>.

En lo referente a la transmisión por fomites o aerosoles, es poco probable por la escasa viabilidad del virus a el medio ambiente <sup>5</sup>.

La infección con el FeLV en gatos domésticos existe en todo el mundo y varía de entre 1- 10% en gatos saludables <sup>11</sup>. La prevalencia se ha reportado de hasta el 38% solo en gatos enfermos<sup>15</sup>. La prevalencia puede ser mucho mayor en gatos que salen al exterior y en gatos sociables <sup>8</sup>, también se ha descrito una mayor prevalencia en gatos enteros respecto a gatos castrados, en gatos adultos que en gatos jóvenes <sup>16</sup>. La infección es más común en gatos machos que salen de su hábitat de entre 1- 6 años de edad <sup>13</sup>.

Algunas enfermedades como el linfoma son asociadas a una alta probabilidad de infección del FeLV, arriba del 75% <sup>15</sup>.

Hoy en día los datos de prevalencia del virus han mostrado una disminución de la tasa de infección en algunas poblaciones<sup>17</sup>, debido principalmente a la instauración de programas de erradicación basados en el uso de vacunas y el mejoramiento de las pruebas de diagnóstico<sup>15, 2</sup>.

### 1.3 PATOGENIA

Se trata de una infección persistente y se acompaña de alteraciones o desequilibrios en el sistema inmune. La infección por el FeLV está influenciada por la capacidad de respuesta inmune que tiene el gato expuesto, la edad, la carga viral inicial, la vía de inoculación, la duración, frecuencia de exposición etc. El sitio de entrada del virus por lo general es oronasal debido al acicalamiento mutuo de los gatos en la cabeza (cuadro 2) <sup>18,5,6</sup>.

**Cuadro 2.-** Estadios de la patogenia del FeLV y resultados de diferentes pruebas de detección por etapa.

ESTADIO	DÍAS	EVENTOS	PRUEBAS
1	1-4	Replicación local en tejido linfoide cercano al sitio de exposición.	IFA negativo ELISA negativo PCR negativo
2	2-14	Diseminación a la circulación. Escasos linfocitos B y macrófagos circulantes infectados.	IFA negativo ELISA positivo PCR positivo
3	3-21	Replicación viral amplificada en el bazo, ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado.	IFA negativo ELISA positivo PCR positivo
4	3-21	Replicación en médula ósea y células epiteliales de las criptas intestinales.	IFA negativo ELISA positivo PCR positivo
5	14-28	Viremia periférica. El virus se incorporó a los neutrófilos y las plaquetas.	IFA positivo ELISA positiva PCR positivo
6	28-56	La infección epitelial y glandular diseminada. El virus es excretado en saliva y lágrimas	IFA positivo ELISA positiva PCR positivo

19,20,13

## ETAPAS DE INFECCIÓN

### ✓ Infección abortiva

La respuesta inmunitaria del gato es eficaz produciéndose solamente una preinfección en orofaringe que es controlada por el sistema inmune sin que exista alguna diseminación.

Ocurre en un 20-30% de los casos<sup>21</sup>.

La infección abortiva es causada cuando un gato fue expuesto a dosis muy bajas del FeLV<sup>22</sup>.

### ✓ Infección regresiva

El 30-40 % de los gatos sufren una viremia transitoria regresiva que dura 3-4 semanas, durante la cual son contagiosos y serológicamente positivos a la proteína p27<sup>21</sup>. Después presentan una fuerte respuesta inmunológica que elimina la carga viral, el riesgo de patología asociada al FeLV es mínimo<sup>23</sup>. Cuando un gato presenta la infección regresiva, esta puede ser reactivada porque la información para producir partículas víricas completas está presente en el animal y se puede activar cuando la producción de anticuerpos disminuye<sup>22</sup>. Por consiguiente, los animales resultarán negativos a las pruebas que detecten la proteína p27, pero con la técnica de PCR si se puede detectar el genoma viral. Los gatos no eliminan el virus totalmente, pero no son infectantes ni se produce replicación viral<sup>21</sup>.

### ✓ Infección progresiva o persistente

La viremia perdura más de 3 semanas sin que el sistema inmune desarrolle anticuerpos neutralizantes por lo cual el virus invade la médula ósea<sup>21</sup>.

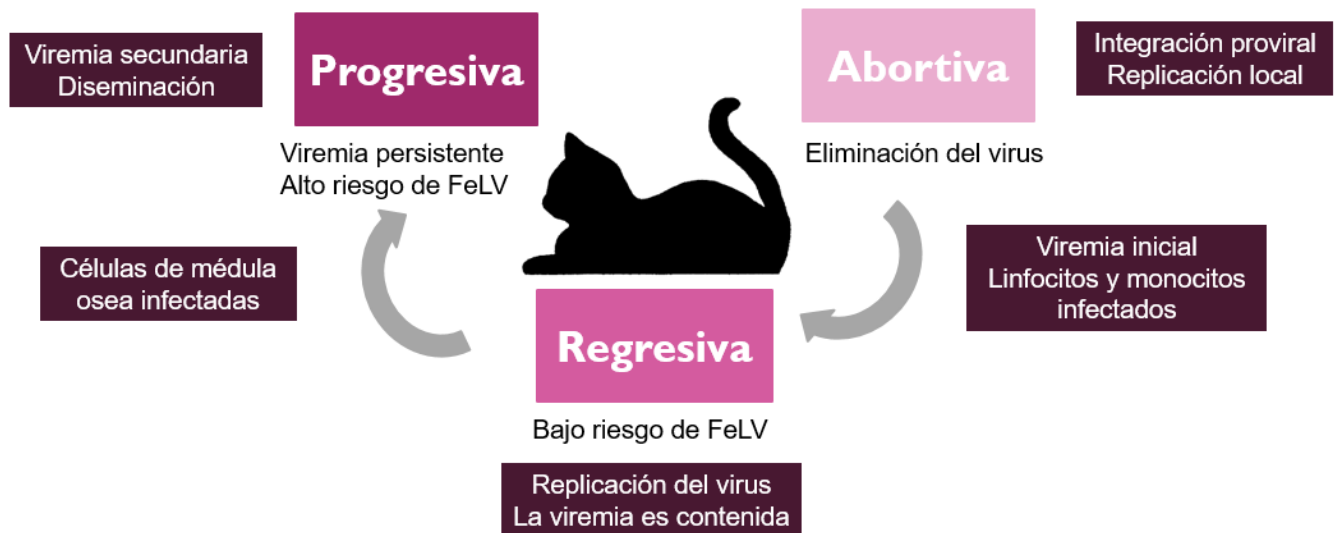
Caracterizada por una elevada carga viral. Estos gatos son positivos para el antígeno p27 de forma persistente y corren el riesgo de presentar patologías asociadas al virus y son fuente de infección para otros gatos<sup>23</sup>.

El 83% de los gatos con enfermedad progresiva mueren 3.5 años después de identificarlos positivos<sup>18</sup>.

✓ Infección atípica

Está presente en menos del 5% de los gatos. Son animales que tienen resultados discordantes a las diferentes pruebas, por ejemplo: serológicamente positivos a la proteína p27, pero negativos a PCR<sup>22</sup>.

La prueba revela antígeno viral provenientes de diferentes tejidos infectados pero el virus no se replicó en sangre ni en médula ósea, por lo que no es infectante (figura 2) <sup>5, 21</sup>.



**Figura 2.-** Patogenia y etapas de infección del FeLV.



## 1.5 SIGNOS CLÍNICOS

La patología asociada al FeLV puede darse en gatos de cualquier edad, pero es más común en gatos jóvenes y en los que viven con otros gatos infectados<sup>23</sup>.

Una vez que el virus entra al organismo, existen tres etapas

1. Enfermedad primaria, aparente o no aparente
2. Muerte o recuperación aparente
3. Enfermedad recurrente o final<sup>7</sup>.

La enfermedad primaria con frecuencia es completamente inaparente, los gatos que presentan la enfermedad primaria aparente muestran grados variables de fiebre, malestar general, anorexia, linfadenopatía, anemia y trombocitopenia. Los signos clínicos persisten de 2-16 semanas, aunque algunos gatos mueren en este tiempo<sup>7,24</sup>.

Los signos clínicos asociados al FeLV son muy variables, la inmunosupresión predispone a los gatos a infecciones secundarias. Con frecuencia el gato tiene una historia vaga de anorexia prolongada, depresión, anemia a veces fiebre recurrente<sup>25, 7</sup>.

Con fines descriptivos, las enfermedades asociadas al complejo del FeLV se dividen en dos categorías:

1. Enfermedades neoplásicas
  - a. Mieloproliferativa
  - b. Linfoproliferativa
2. Enfermedades no neoplásicas

## 1. Enfermedades neoplásicas

### *a) Mieloproliferativa*

- ❖ Leucemia linfocítica ocurre con más frecuencia en adultos jóvenes<sup>26</sup>.
- ❖ Leucemia eritroide. Afecta tanto a la línea mielocítica como la eritrocítica<sup>6</sup>.
- ❖ Mielosis eritroide: consiste en la proliferación de las células precursoras del eritrocito en la médula ósea. Se observa asincronismo en la maduración del núcleo y el citoplasma de muchos de los rubricitos afectados. El hematocrito es bajo y se detectan glóbulos rojos nucleados, anisocitosis, policromasia y reticulocitosis<sup>6</sup>.

Los signos clínicos son generalmente inespecíficos y se reducen a letargia, anorexia, pérdida de peso y palidez<sup>26</sup>.

### *b) Linfoproliferativa*

Los linfomas representan una manifestación común de la infección por el FeLV y la clasificación de estos se basa en su localización.

- ❖ Linfoma mediastínico o tímico: es el más comúnmente observado en gatos jóvenes. Las masas tumorales se originan en el tejido linfático mediastínico anterior. Producen compresión de la tráquea con lo que causa disfagia, disnea y tos<sup>15</sup>.  
El derrame pleural es una secuela frecuente, el líquido contiene linfocitos malignos que pueden servir para el diagnóstico<sup>6</sup>.
- ❖ Linfoma gastrointestinal o alimentario: se observa en gatos de alrededor de 8 años de edad. El tejido tumoral se desarrolla a partir de linfonodos mesentéricos o en el parénquima de los órganos abdominales. Los signos clínicos son vagos pérdida de peso, fiebre, enteropatías perdedoras de proteínas, vómito y diarrea. El diagnóstico se realiza por biopsia<sup>6, 15</sup>.

- ❖ Linfoma multicéntrico: los crecimientos tumorales involucran diversos sitios <sup>15</sup> como piel, cavidad nasal, ojo, hígado o SNC<sup>6</sup>.
- ❖ Linfoma renal: los signos clínicos que producen este tipo de linfoma son los de una insuficiencia renal, con diversos grados de azotemia, pueden estar involucrados ambos riñones y a la palpación se detectan de forma nodular y alargada<sup>7</sup>.
- ❖ Linfoma neurológico: es raro y los signos varían de paraplejia, convulsiones, vocalizaciones etc.<sup>7</sup>

## 2. Enfermedades no neoplásicas

- ✓ Anormalidades gastrointestinales
- ✓ Atrofia del timo
- ✓ Infecciones secundarias
- ✓ Trastornos reproductivos
- ✓ Glomerulonefropatías
- ✓ Lesiones oculares<sup>19, 6,7,4</sup>.

## 1.6 ALTERACIONES EN EL ANÁLISIS CLÍNICO

En gatos infectados es posible esperar un conteo de hematocrito, hemoglobina, eritrocitos y plaquetas significativamente bajo. Los gatos naturalmente o artificialmente infectados desarrollan anemia muy marcada con valores de hematocrito entre 4%-15%<sup>2</sup>.

Es común encontrar estos trastornos causados por la supresión de la médula ósea; trastornos hematológicos que incluyen anemia (no regenerativa o regenerativa) que es una complicación importante no neoplásica, neutropenia persistente transitoria o cíclica, anormalidades a nivel plaquetario ya que la vida útil de las plaquetas se acorta<sup>28</sup>.

Gatos infectados con el FeLV son más propensos a desarrollar algún tipo de citopenia (niveles bajos de eritrocitos, plaquetas y neutrófilos). La linfocitosis también es un hallazgo común en gatos enfermos<sup>25</sup>.

- Anemia no regenerativa: ocurre sola o en combinación con niveles bajos de linfocitos, neutrófilos y plaquetas<sup>20</sup>.
- Anemia regenerativa: se encuentra en gatos con destrucción inmunomediada de eritrocitos inducida por el FeLV o en coinfección con *Mycoplasma haemofelis*.
- Azotemia renal: aparece en gatos con Linfoma renal.
- Hiperbilirrubinemia
  - Prehepática: está relacionada con la destrucción inmunomediada de los eritrocitos inducida por el FeLV
  - Hepática: relacionado al desarrollo de linfomas hepáticos o lipidosis hepática
  - Posthepática: por linfoma alimentario.
- Proteinuria: ocurre en algunos gatos infectados con el FeLV, secundariamente a glomerulonefritis.
- Linfocitos malignos: son fácilmente identificados por citología<sup>19</sup>.

## 1.7 RESPUESTA INMUNE CONTRA EL FeLV

La respuesta inmune que proporciona una inmunidad más eficaz contra la infección por el FeLV se relaciona con la presencia de anticuerpos neutralizantes (acVN), los cuales actúan uniéndose directamente sobre la gp70, evitando de esta forma su unión a células susceptibles y su posterior penetración del virus.

Los gatos que poseen una viremia persistente poseen títulos muy bajos o nulos de acVN, mientras que en los gatos que han resistido la infección se encuentran títulos muy altos. La transferencia pasiva de acVN a través del calostro en forma artificial, ha mostrado también la protección contra la viremia después del desafío con el FeLV<sup>29,7</sup>.

La respuesta celular de linfocitos T CD8+ citotóxicos (implicada en la eliminación de células infectadas) se produce 1-2 semanas después de la infección y antes de la aparición de los anticuerpos neutralizantes<sup>30</sup>.

Las células transformadas por el FeLV a diferencia de las células infectadas no transformadas expresan un nuevo antígeno vírico en su membrana plasmática (Antígeno de oncovirus asociado a la membrana; FOCMA) y los anticuerpos dirigidos contra el mismo, al igual que los anticuerpos contra los antígenos de la envoltura protegen a los gatos de la enfermedad<sup>3</sup>. Los anticuerpos contra el FOCMA tienen una ligera actividad protectora contra el desarrollo de neoplasias relacionadas al FeLV, pero no previenen las manifestaciones no neoplásicas inducidas por este<sup>5</sup>.

Los gatos virémicos tiene suprimidas las respuestas blastogénicas de las células T, así como las respuestas de anticuerpos, presentan un tiempo de rechazo a los injertos prolongado, atrofia tímica, depleción de la zona cortical de los linfonodos y un fracaso total de la producción de interferón<sup>3</sup>.

## 1.8 DIAGNÓSTICO

Los signos clínicos que acompañan a las infecciones por el FeLV son insuficientes para lograr una determinación certera de la infección, por esto se hace necesario recurrir al diagnóstico de laboratorio.

Como resultado de la síntesis viral en las células huésped se produce una alta cantidad de proteína p27, que es el antígeno detectado por algunas de las pruebas diagnósticas comerciales para el FeLV<sup>5</sup>.

Los métodos que se emplean pueden ser

- Serológicos: permiten el diagnóstico a través de reacciones antígeno-anticuerpo.
  - Inmunoensayo de flujo lateral
  - IFA (inmunofluorescencia)
  - ELISA
  
- Viroológicos: se basa en la detección de la presencia del virus o de su ácido nucleico.
  - Aislamiento viral
  - PCR

### 1.8.1 INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL

Es un método similar al ELISA, detecta la proteína p27 y su sensibilidad y especificidad de ambas técnicas son comparables<sup>21</sup>.

En la prueba se genera una banda o un spot de color marrón como resultado de una reacción inmunológica demostrando la presencia del antígeno viral p27. Son comercialmente conocidos como SNAP's y son los más utilizados por su fácil manejo, rápido resultado y su alta sensibilidad (cuadro 3)<sup>2</sup>.

**Cuadro 3.-** Características de los Kits comerciales utilizados para el diagnóstico del FeLV.

Test	Detecta	Lab.	País	Test	Detecta	Lab.	País
<b>Witnes</b>	Ag p27	Synbiotics	USA	<b>PetChe FeLV</b>	Ag p27	IDEXX	USA
<b>Snap combo plus</b>	Ag p27	IDEXX	Alemania	<b>One'Step</b>	Ag p27	Biotech	USA
<b>Fastest</b>	Ag p27	MegaCor	Francia	<b>Mapic FeLV</b>	Ag p27	EVL	Países Bajos
<b>Duo Speed</b>	Ag p27	BioVeto Test	USA	<b>DRG</b>	Ag p27	DRG	USA
<b>Virachek FeLV</b>	Ag p27	Synbiotics	USA				

### **1.8.2 INMUNOFLUORESCENCIA**

Los ensayos de inmunofluorescencia en las células procedentes de muestra clínica pueden utilizarse para realizar investigaciones diagnósticas rápidas, siempre que el laboratorio disponga de un microscopio de fluorescencia y un experto<sup>31</sup>.

Detecta antígeno vírico p27 intracelular en el citoplasma de células linfoides, neutrófilos y plaquetas de sangre y médula ósea<sup>24</sup>.

La sensibilidad de esta prueba respecto al aislamiento vírico como método de elección es casi del 100%, esta prueba se utilizaba rutinariamente hasta la aparición de la PCR<sup>21</sup>. Pero solo se obtienen resultados positivos cuando el virus ha llegado a la médula ósea de donde se liberan células infectadas, esto hace que se puedan evidenciar a los gatos virémicos persistentes muy fácilmente<sup>6</sup>.

### **1.8.3 ELISA**

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo<sup>32</sup>.

El ensayo de adsorción puede indicar la presencia de antígeno viral p27 extracelular libre en el plasma, sangre o suero. Tiene alta sensibilidad del 90% y alta especificidad, cercana al 100%<sup>24,21</sup>.

Los gatos infectados por el FeLV generarán un resultado positivo a la prueba a partir de los 28 días posteriores a la infección<sup>21</sup>. ELISA es una técnica sensible capaz de detectar antígenos tempranos, además de viremia debido a la infección transitoria del FeLV que puede superarse<sup>33</sup>.

Es útil para la detección selectiva de grandes números de muestras en las que se puede detectar la presencia de antígeno (directa) o anticuerpos (indirecta) a partir de muestras clínicas. En todos los casos el sistema de detección es un anticuerpo conjugado con una enzima. Cuando el anticuerpo ligado a la enzima se une a la muestra que se está examinando, la enzima reacciona con un sustrato cromogénico y se produce un cambio de color, que puede medirse espectrofotométricamente o evaluarse visualmente (cuadro 4)<sup>31</sup>.



**Cuadro 4.** Características de los Kits comerciales de ELISA utilizados para el diagnóstico de FeLV.

Test	Detecta	Lab.	País	Test	Detecta	Lab.	País
<b>DRG® FeLV-p27</b>	Ag p27	DRG	USA	<b>INgezim FeLV DAS</b>	Ag p27	Ingenasa	España
<b>DRG® FeLV- GP70</b>	Ac gp70	DRG	USA	<b>INgezim FeLV</b>	Ac p80	Ingenasa	España
<b>ASSURE® FeLV</b>	Ag p27	Zoetis	Mex	<b>FeLV-p27 antigen Assay Kit</b>	Ag p27	Deme ditec	Alema- nia

Distintos fabricantes han desarrollado variantes del ELISA como inmunocromatografía (ICGA), inmunomigración rápida (IMR) y se presentan en forma de kit con formato diferente de la microplaca tradicional<sup>31</sup>.

#### 1.8.4 AISLAMIENTO VIRAL

El aislamiento del virus puede ser relativamente lento, tardando aproximadamente de 2-3 semanas. Sin embargo, si el cultivo tiene éxito, el material vírico puede estudiarse mediante microscopía electrónica (ME) y mediante técnicas moleculares. El aislamiento vírico necesita tejido fresco<sup>31</sup>.

El aislamiento en cultivos celulares es el último criterio para determinar la presencia del FeLV. En Las fases tempranas de la enfermedad, el aislamiento es el parámetro más sensible, aunque en general no es el método de primera elección<sup>21</sup>.

### 1.8.5 PCR

Es la técnica adecuada cuando se trata de poner en evidencia las infecciones latentes o las infecciones discordantes, en las que no hay infección en médula ósea<sup>6</sup>.

- ✓ ADN: permite la identificación del material genético proviral y también es posible cuantificarlo.
- ✓ ARN: se detecta el material genético (ARN) directamente del virus de leucemia felina en sangre entera, plasma, suero, saliva o heces (4). Permite la detección del virus en ausencia de células en las que se haya integrado<sup>21</sup>.

La detección de ADN proviral mediante la técnica de PCR en los leucocitos de sangre periférica permite el diagnóstico de la infección por el FeLV<sup>34</sup>.

Las técnicas de PCR-cADN (el cADN es ADN complementario que se obtiene utilizando ARN y transcripción inversa) y PCR-ADN no ofrecen la misma información. Muchos animales que han superado la viremia aún tienen provirus con lo que el resultado será positivo con la PCR-ADN, pero sin detección del virus por parte de la PCR-cADN. Por este motivo la PCR-cADN se utiliza para la detección de animales virémicos (cuadro 5)<sup>21</sup>.

**Cuadro 5.-** Interpretación de diferentes resultados obtenidos en ELISA y PCR para la detección del FeLV.

Prueba de ELISA 15 días	Prueba de ELISA 2 meses	PCR Médula	Diagnóstico Final
-	No necesaria	-	Sin enfermedad
-	No necesaria	+	Portador latente
+	-	-	Inmunocompetente Infección regresiva
+	-	+	Portador Latente
+	+	-	Atípico
+	+	+	Virémicos persistente

7,24,6

### 1.9 MANEJO

Los clínicos recomiendan que debe haber revisiones en los gatos cada 6 meses para realizar la historia clínica, exploración física, hemograma, química sanguínea y análisis de orina para poder identificar problemas de salud de forma temprana<sup>23</sup>.

Para prevenir la propagación del FeLV hay que tomar en cuenta que los retrovirus no son viables demasiado tiempo fuera del hospedador y las prácticas rutinarias de manejo y desinfección son adecuadas para prevenir la propagación en un entorno hospitalario<sup>23</sup>.

En un escenario doméstico los animales deberán ser confinados en el interior para evitar, por un lado, contagiar a otros gatos, y por otro, para preservarles a ellos del contagio de cualquier otro proceso infeccioso que pudiera complicar su cuadro clínico<sup>21</sup>.

## 1.10 TRATAMIENTO

En primer lugar, se debe resolver los aspectos que pueden comprometer la vida del animal, como deshidratación, anemia severa etc. El tratamiento de las infecciones secundarias a la inmunosupresión puede tratarse de forma sintomática conforme se vayan presentando<sup>26</sup>. En tercer lugar, el uso de inmunomoduladores y, por último, los fármacos específicos que pueden inhibir la replicación viral también deben ser considerados en la terapia<sup>7</sup>.

### Terapia antiviral (antirretrovirales)

- ❖ Zidovudina: en gatos con la forma no neoplásica se ha obtenido un notable incremento en el tiempo y calidad de vida<sup>6</sup>. Es un derivado nucleósido que produce bloqueo de la transcriptasa reversa de los retrovirus. Inhibe la replicación del FeLV en animales infectados experimentalmente reduciendo la carga viral. La dosis es de 5-10mg/kg cada 12 horas por vía oral o subcutánea<sup>35,22</sup>.
- ❖ Interferón felino: inhibe la recombinación del virus *in vitro* y se ha comprobado que en animales virémicos persistentes puede promover la mejoría de los signos clínicos. En dosis de 1MU (Miliuinidades)/kg cada día, subcutánea durante 5 días consecutivos<sup>21, 24</sup>.
- ❖ Raltegravir: produce la inhibición de la integrasa en la replicación del FeLV, con un tratamiento de 15 semanas disminuye la carga viral, aunque la viremia no se llega a resolver completamente. Dosis de 40mg/kg al día durante 5 semanas<sup>21, 36</sup>.

## Inmunomoduladores

- ❖ Interferón alfa: es una de las tres principales clases de interferón que muchas células del organismo humano producen en respuesta a infecciones virales. Es secretado por leucocitos infectados para reforzar las defensas de las células cercanas no infectadas. Como inmunomodulador a largo plazo 30-60 U/gato PO c/24hrs 7 días si y 7 días no.
  
- ❖ Acemanano: estimula la producción de interleucina 1, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa y prostaglandina E2 por macrófagos. 1mg/kg IP cada 7 días por 6 semanas.
  
- ❖ *Propionibacterium acnes*: es un inmunoestimulante no específico o inmunomodulador que induce una liberación endógena de interferón e interleucina1. También activa los macrófagos y mejora la inmunidad mediada por células. 0.25-0.5 /gato una o dos veces por semana SC o IV durante 15 días.
  
- ❖ Prednisolona: puede inducir estimulación del apetito y reducción a corto plazo en el tamaño de las masas linfomatosas. Sin embargo, las dosis inmunosupresoras pueden ser perjudiciales. 0.5-1mg/kg/12hrs PO<sup>26, 7, 24, 36</sup>.

## 1.11 PREVENCIÓN

Varios tipos de vacunas (cuadro 6) han sido introducidas en el mercado que han probado proveer protección en contra de la viremia persistente. El uso de estas vacunas, así como el incremento del uso de pruebas diagnósticas de rutina a los gatos es responsable de disminuir la prevalencia de FeLV en las poblaciones de felinos domésticos<sup>14</sup>.

**Cuadro 6.-** Diferentes tipos de vacunas comerciales utilizadas en México.

VACUNA COMERCIAL	FABRICANTE	CARACTERÍSTICAS	ADYUVANTE	SUB GRUPO
Leucogen	Virbac	Molécula recombinante de leucemia felina p45 al menos de 102 µg	Quil A E Hidróxido de aluminio	A
Leucocell 2	Pfizer	Suspensión de antígenos virales de leucemia felina GP70, no menos de 1334 mg / dosis y FOCM	Adyuvante estéril y gentamicina	A, B, C
Purevax	Merial	Virus canaripox recombinante FeLV	Sin adyuvantes. Gentamicina como vehículo	A

Modificado de Marin & Zagal <sup>7,37</sup>

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La infección en gatos domésticos por el FeLV está ampliamente distribuida en México, al menos, en el centro del país como menciona Ramírez, 2016. No se han hecho suficientes estudios sobre los genotipos virales que infectan los felinos en el país y las vacunas, aunque disponibles en el mercado no se han realizado estudios sobre su efectividad contra la infección por el FeLV. Es por ello que el diagnóstico efectivo es una herramienta importante para monitorear la salud de los gatos. Sin embargo, al igual que en las vacunas no existen suficientes estudios que demuestren que técnica y en qué fase de infección son las más idóneas para ser utilizadas. El presente estudio pretende evaluar plasmas con pruebas serológicas comerciales disponibles en el mercado y determinar su eficacia al comparar dichos resultados con datos previos obtenidos con otras pruebas realizadas anteriormente en el laboratorio de virología.

### **3. HIPÓTESIS**

Los resultados de detección de la infección por FeLV en la prueba de ELISA correlacionaran con los resultados previamente obtenidos por medio de la PCR.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Detectar la presencia del antígeno viral (p27) de leucemia felina (FeLV) en plasmas felinos mediante un ELISA comercial.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Detectar por medio de una prueba de ELISA comercial el antígeno p27 del FeLV a partir de plasma felino.
- Correlacionar el estado de infección del FeLV de los plasmas comparándolos con pruebas de PCR previamente realizadas.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Hospital Centro Médico Nacional Siglo XXI en la torre de pediatría, unidad de investigación médica en inmunología, laboratorio de Inmuno-Virología a cargo de la M en C. María Martha García Flores.

El cual se ubica en la avenida Cuauhtémoc #330. Colonia doctores, delegación Cuauhtémoc, Ciudad de México, México.

Los plasmas utilizados pertenecen a un banco de muestras remitidas para el servicio de diagnóstico del FeLV del laboratorio de virología de la FES-Cuautitlán. UNAM, que consistió en una población de 89 gatos domésticos provenientes del Estado de México y zonas aledañas, mayores de seis meses de edad, con y sin cuadros clínicos sugestivos de la infección por el FeLV, de las cuales 30 fueron negativas y 59 positivas a la técnica de PCR.

Las muestras de sangre de estos felinos se obtuvieron en tubos con anticoagulante (EDTA) por punción de la vena cefálica o de la yugular externa. La sangre fue centrifugada para separar el plasma y los leucocitos de sangre periférica (LSP), siguiendo el protocolo de Gorodezky, 1998. Estas muestras fueron conservadas a -20° C hasta su uso.

Los plasmas se seleccionaron por fecha de recepción de los más recientes a los más antiguos, siempre y cuando tuvieran resultado de PCR, con un mínimo de 100 µl y el estado del plasma estuviera en condiciones adecuadas.

Con el plasma se realizaron las pruebas de ELISA con el Kit comercial DRG® EIA-2469 (DRG-EUA) para la detección del antígeno viral (p27) del FeLV siguiendo las instrucciones del fabricante mencionadas a continuación:

1. Se lavaron los pozos según el protocolo sugerido.
2. Reconstitución del control positivo (tapa morada) en 0.5mL de agua bidestilada, dividir en alícuotas y almacenar inmediatamente a -20°C hasta su uso.
3. Reconstitución del control negativo (tapa gris) en 1 mL de agua bidestilada, dividir en alícuotas y almacenar inmediatamente a -20°C hasta su uso.
4. Se diluyó el control positivo (tapa morada) 1 + 1 con el buffer de ELISA (tapa verde) y se transfirieron 100µl al pozo correspondiente.
5. Se diluyó el control negativo (tapa gris) 1 + 1 con el buffer de ELISA (tapa verde) y se transfirieron 100µl al pozo correspondiente.
6. Se diluyó la muestra 1+1 con el buffer de ELISA (tapa verde) y se transfirieron 100µl al pozo correspondiente.
7. Se seleccionaron dos pozos para control del sustrato y se colocó solo 100 µl de buffer de ELISA (tapa verde).
8. Se transfirieron 100 µl de todas las muestras problema a su pozo correspondiente.
9. Se incubó por 60 min a 37°C.
10. Se lavó la placa 5 veces, según el protocolo sugerido.
11. Se colocó 100 µl del conjugado anti-felino a todos los pozos.
12. Se incubó por 60 min a 37°C.
13. Se lavó la placa 5 veces, según el protocolo sugerido.

14. Se mezcló gentilmente a partes iguales del buffer A y del buffer B, para preparar la solución del sustrato. Se preparó inmediatamente antes de utilizarse.
15. Se colocó 100 µl de sustrato a cada pozo.
16. Se incubó de 10-13 minutos en oscuridad a temperatura del laboratorio (21°C).
17. Se añadió 50 µl de solución de paro a cada pozo y se mezcló bien.
18. Se leyó la placa en un espectrofotómetro inmediatamente, a 450nm usando una longitud de onda de 620nm como referencia (38).

Posteriormente los sueros considerados como sospechosos se reevaluaron a la misma proteína p27 por medio de un kit de inmunoensayo de flujo lateral (DRG FeLV Ag Rapid Test RAP-4816, EUA) del mismo proveedor.

1. Destapar la prueba y la pipeta, solo abrir las pruebas que se van a utilizar inmediatamente.
2. Añadir dos gotas de suero o plasma a la zona de muestra con ayuda de la pipeta.
3. Añadir dos gotas de buffer del gotero a la zona de muestra.
4. Leer los resultados después de 5-20 minutos.
  - a. Positivo: dos bandas son visibles en la zona T y C.
  - b. Positivo débil: dos bandas son visibles, una débil en la zona T y otra en la zona C.
  - c. Negativo: solo una banda es visible en la zona C.
  - d. No valido: no hay banda visible en la zona C.

## 7. RESULTADOS

Después de realizar la lectura de la placa de ELISA (figura 3) no se detectó ninguna muestra positiva según los criterios establecidos por el fabricante, sin embargo, se consideraron 12 muestras sospechosas ya que tuvieron lecturas altas en el espectrofotómetro, por lo que fueron reevaluados en un kit de inmunoensayo de flujo lateral del mismo laboratorio y que utiliza la misma proteína p27 del FeLV.

De los 12 sospechosos, 8 fueron positivos y 4 negativos a la prueba de inmunoensayo.



**Figura 3.**-Fotografía de los resultados obtenidos en la prueba de ELISA.

CS: control del sustrato; CN: control negativo; CP: control positivo; S: sospechoso.

Se recopilaron los datos de la PCR, ELISA e inmunoensayo de flujo lateral que se muestran en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Resultados obtenidos en la detección del FeLV con ELISA (E), PCR (P) e inmunoensayo de flujo lateral (I).

	E	P	I		E	P	I		E	P	I		E	P	I								
292	-	+		261	-	+		242	-	+		151	-	+		145	-		12	-	+		-
286	S	+	+	260	-	+		55	S	-	+	289	-	-		144	-		13	-	+		-
285	-	+		257	-	+		238	-	+		283	-	-	+	143	-		22	-	+		
284	S	+	+	256	-	+		234	-	+		266	-	-		142	-		23	-	+		-
282	-	+	-	255	-	+		232	S	+	-	198	-	-		141	-		25	-	+		-
281	-	+	-	254	-	+		226	-	+		197	-	-		138	S		26	-	+		-
280	-	+	-	253	-	+		225	-	+		196	-	-		135	-		27	-	+		-
279	-	+		252	-	+		224	-	+		162	-	-		132	-		28	-	+		-
278	-	+		251	-	+		223	-	+		161	-	-		1	-		31	-	+		-
277	-	+		249	-	+		190	-	+	-	159	-	-		2	S		32	-	+		+
276	-	+		52	-	-		54	-	-	-	156	-	-	+	3	-		36	-	S		+
49	S	-	+	247	-	+		160	-	+		155	-	-		4	-		37	-	+		-
271	-	+		246	-	+		158	-	+		154	-	-		5	S		40	-	+		-
270	S	+	+	245	-	+		157	-	+		152	-	-		8	-		45	-	+		-
267	-	+		243	-	+		153	-	+		147	S			11	-		X	-	+		

S= sospechoso; (-) = negativo y (+) = positivo.

En el cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos con la prueba de inmunoensayo de flujo lateral, 12 realizados en este trabajo a las muestras con resultado sospechoso en la prueba de ELISA y 34 resultados previamente realizados y que estaban disponibles en la historia clínica de las muestras.

Las muestras sospechosas a la prueba de ELISA que resultaron positivas al inmunoensayo de flujo lateral fueron consideradas como positivas en la prueba de ELISA.

En cinco muestras hubo coincidencia de positividad entre la PCR y el inmunoensayo de flujo lateral. El conjunto de los resultados permitió establecer cuatro grupos según su estado de infección con el FeLV los cuales se muestran en el cuadro 8.

**Cuadro 8.-** Muestras agrupadas según su estatus clínico considerando el resultado de las pruebas de ELISA, PCR e inmunoensayo de flujo lateral.

ESTATUS CLÍNICO	PORCENTAJE	NÚMERO DE ANIMALES
Virémicos Persistente	6 %	5
Portador latente Inmunocompetente	61%	54
Atípico	10 %	9
Sin infección	23 %	21

Al analizar el estatus clínico de los animales evaluados se puede establecer que la mayoría de los gatos son inmunocompetentes y pudieron combatir la infección, es decir que se encuentran en la infección regresiva.

El 23% de los gatos estudiados no presentaron infección, ya que resultaron negativos a todas las pruebas realizadas.

## 8. DISCUSIÓN

Al realizar la lectura de la placa de ELISA en el espectrofotómetro se observó que hubo una sobre exposición al cromógeno, por lo que no fue posible establecer fielmente los valores de absorbancia del control positivo. Por lo cual se decidió seleccionar las muestras que tuvieron una mayor lectura (sospechosos) y se les realizó la evaluación con la prueba de inmunoensayo de flujo lateral desarrollada por el mismo fabricante de la prueba de ELISA.

Este estudio determinó el estatus clínico de gatos que forman parte de la base de datos del laboratorio de virología, ya que como menciona Levy, 2009 el estatus de infecciones retrovirales de los gatos debe ser conocido debido a las serias consecuencias que pudieran ocasionar estos virus a su estado de salud, además del manejo con dichos gatos infectados debe ser especial.

Como menciona la Asociación Americana de Practicantes Felinos, la identificación y segregación de los gatos infectados es el método más efectivo para prevenir infecciones por el FeLV. El estado de infección de todos los gatos, incluso los vacunados tiene que ser determinado<sup>39</sup>.

Para los gatos que ingresan a un nuevo hogar o que se sabe que tienen un alto riesgo de exposición, las pruebas deben repetirse 30 días después de la primera evaluación, en caso de una infección reciente que aún no haya resultado en la presencia de antígeno circulante detectable.

La documentación de una prueba negativa previa no evita la necesidad de repetir las pruebas en las situaciones anteriores. La vacunación previa no interfiere con las pruebas de diagnóstico a menos que se realice inmediatamente antes de la extracción de sangre para las pruebas de antígenos<sup>40</sup>.

El diagnóstico de la infección por el FeLV está basado principalmente en la detección del virus o de antígeno viral en el plasma, suero o sangre completa. Las pruebas serológicas más comunes detectan la presencia del antígeno p27 <sup>41</sup>. En este estudio se realizaron pruebas de ELISA e inmunoensayo de flujo lateral (IFL) que detectan ambos la presencia de la proteína p27 del FeLV.

Este antígeno es detectado en los primeros 30 días posteriores a la infección durante la etapa de viremia principal y en todos los estados de infección en gatos con infección progresiva<sup>42</sup>, basado en esto se pudo determinar que el 6% de los gatos de este estudio tiene infección progresiva ya que resultaron positivos a ambas pruebas (IFL y PCR).

En el presente estudio las pruebas de ELISA e IFL se realizaron con plasma sanguíneo ya que como menciona Barr, 1996, en evaluaciones tempranas los resultados son mas confiables cuando se realizan en suero o plasma que en sangre completa, por lo tanto, en evaluaciones primarias es importante realizarlas en suero o plasma para evitar falsos negativos .

Como menciona Minovich, 2004 <sup>43</sup> las pruebas de ELISA o IFL al ser positivas indican que hay infección, pero no el grado de enfermedad o la fase en la que se encuentra el gato. Con una prueba positiva no se puede emitir un pronóstico y se deben reevaluar los animales con intervalos de uno a tres meses. Debido a esto, en esta investigación se tomaron en cuenta los resultados de PCR y de ELISA y/o IFL para correlacionarse entre sí y así poder determinar la fase de infección de todos los felinos aquí evaluados.

Al realizar este trabajo se esperaba correlacionar las muestras previamente evaluadas a PCR con la técnica de ELISA y que los resultados fueran semejantes como se estableció en la hipótesis. No obstante, solo 21 muestras coincidieron en obtener resultados negativos y 5 muestras en obtener resultados positivos en ambas pruebas. Lo cual situa a estos 21 animales en el estatus clínico de sin enfermedad y los otros 5 en virémicos persistentes.

Quedando así 63 muestras en las cuales los resultados no son concordantes en ambas técnicas utilizadas y situandolos en el estatus de infección regresiva o atípica.

En el cuadro 9 podemos observar la comparación de datos de diferentes autores sobre el porcentaje de gatos según su estatus de infección y los datos obtenidos en el presente estudio.



**Cuadro 9.-** Clasificación del tipo de infección del FeLV según diferentes referencias bibliográficas.

	<b>Infección Progresiva</b>	<b>Infección Regresiva</b>	<b>Infección Atípica</b>	<b>Infección Abortiva</b>
<b>Nelida Gomez, et al 2010</b>	30%	60%	5-10%	15%
<b>Norworthy, 2009</b>	40%	30%	1%	30%
<b>Aybar, 2015</b>	30-40%	30-40%	<5%	20-30
<b>Sturgess, 2004</b>	30%	70%	10%	30%
<b>Ortiz, 2018</b>	6%	61%	10%	_____

En la tabla se observa que los resultados del presente estudio son concordantes con lo referido en la bibliografía, con excepción de la infección progresiva de la cual en el presente estudio se encontró un porcentaje mucho más bajo que la media (33%). Se necesitaría haber reevaluado a los gatos positivos 30 días después para poder conocer a ciencia cierta su estatus clínico. Aunque por otro lado Ettinger y Cols, 2017<sup>4</sup> mencionan que la prevalencia de la infección progresiva es cerca del 1% en gatos sanos y del 15% en gatos enfermos o de alto riesgo.

En el congreso veterinario de León del 2017 <sup>51</sup>, en México, la doctora Susan Little mencionó que al obtener un resultado positivo a la infección por el FeLV se debe evaluar inmediatamente con otra prueba diferente, pero confiable. Si la segunda prueba también es positiva, el gato probablemente tenga una infección progresiva (especialmente si hay signos clínicos de apoyo). Si la segunda prueba resulta negativa, es posible que el primer resultado de la prueba haya sido un falso positivo o que el gato esté infectado de manera regresiva y es improbable que transmita la infección o desarrolle una enfermedad clínica.

Otra opción que mencionó la Dra. Little es que es adecuado evaluar inmediatamente a los gatos con una PCR validada para ADN proviral usando sangre completa. Si la PCR también es positiva, el gato puede estar infectado progresivamente (especialmente si hay signos clínicos de apoyo) o el gato puede desarrollar una infección regresiva si el gato está clínicamente bien. Las pruebas de PCR pueden ser necesarias para aclarar el estado de infección.

Basado en esta segunda opción la cual permitió establecer el estatus de las muestras que se estudiaron en este trabajo, no obstante, la prueba de inmunoensayo de flujo lateral fue la prueba que complementó los resultados de la PCR, no así la prueba de ELISA que no detectó animales infectados.

El costo promedio de la prueba de Elisa para el FeLV está en \$310 pesos, el de la prueba de inmunoensayo de flujo lateral está en promedio en \$350 y la PCR en aproximadamente \$700. Por lo que el IFL parece ser una buena opción en el ámbito de la clínica ya que no muestra diferencia significativa en el costo de la prueba y el resultado se obtiene al instante y la cantidad de muestra necesaria es menor.

Sin embargo en el área de laboratorio de virología , genética y biología molecular de la FES Cuautitlán se pretende estandarizar una prueba de ELISA indirecta basada en péptidos sintéticos que detecte anticuerpos basándose en secuencias conservadas de la región env con fines de disminuir el costo de la prueba.

## 8. CONCLUSIONES

- Con la prueba de ELISA se logró establecer animales sospechosos.
- La prueba de inmunoensayo de flujo lateral mostró en este estudio ser más eficiente, confiable y práctica de realizar que el ELISA en el ámbito de la clínica ya que se obtienen los resultados en poco tiempo.
- Las evaluaciones de PCR previamente realizadas permitieron correlacionar los resultados obtenidos en el ELISA e inmunoensayo de flujo lateral, con lo cual se logró asignar su estatus infeccioso a cada animal evaluado.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ortiz, J. Three clinical cases of Feline leukemia associated with a regenerative anemia, breast carcinoma, or peritonitis. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2011; 24(1): 55-62.
2. Calle, J, Fernández, L, Morales, L, Ruiz, J. Virus de la leucemia felina: un patógeno actual que requiere atención en Colombia. Veterinaria y Zootecnia. 2013; 7(2): 117-138.
3. Fenner, F. Virología Veterinaria. España: Acribia; 1992.
4. Ettinger, S. Veterinary internal medicine. EUA : ELSEVIER; 2017.
5. Valenzuela, M, Muñoz, L, Villouta, G, Tello, L. Leucemia Viral Felina (Parte II). Monografías Med Vet. 2002; 22(1-2): 22-29.
6. Gómez, N, Guida, N. Enfermedades Infecciosas de los Caninos y Felinos. Argentina: Intermédica; 2010.
7. Marín, J. Enfermedades de los gatos y su manejo clínico. México : CEAMVET; 2014.
8. Ávila, N, Parra, O, Barrios, L, Bello, M. Prevalencia de Leucemia Viral Felina, Inmunodeficiencia Viral Felina y Dirofilariosis Felina en Gatos Refugiados en un Albergue de Animales en Maracaibo, Venezuela. Revista Científica. 2015; 25(4): 285-292.
9. Suárez, G. Retrovirus animales y salud pública. Madrid : Real academia nacional de medicina; 1993.
10. Autran, M. Uso de la técnica de PCR para confirmar el diagnóstico de leucemia viral felina y el análisis filogenético de los productos amplificados. Estado de Mexico: Tesis de Maestría; 2014.
11. Ito, J, Baba, T, Kawasaki, J, Nishigaki, K. Ancestral Mutations Acquired in Refrex-1 a Restriction Factor against Feline Retroviruses, during its Cooption and Domestication. Journal of Virology. 2016; 90(3): 1470-1485.
12. Nesina, S, Helfer-hungerbuehler, K, Riond, B, Boretti, F. Retroviral DNA the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naive recipient cats. Retrovirology. 2015; 12(105): 2-18.

13. Liu, D. Molecular detection of animal viral pathogenesis. EUA : CRC Press; 2016.
14. Nelson, R. Small animal internal medicine. Canada: Elsevier; 2014.
15. Grosenbaugh, D, Frances-Duvert, V, Abedi, S, Feilmeier, B. Efficacy of a non adjuvanted recombinant FeLV vaccine and two inactivated FeLV vaccines when subject to consistent virulent FeLV challenge conditions. Elsevier. 2017; 10(004): 76-80.
16. Greene, C. Infectious diseases of the dog and cat. EUA : Elsevier; 2012.
17. Little, S, Sears, W, Lachtara, J, Bienzle, D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. Can Vet. 2009; 50(1): 644-648.
18. Schlecht-louf, G, Mangeney, M, El-garch, H, Lacombe, V. A Targeted Mutation within the Feline Leukemia Virus (FeLV) Envelope Protein Immunosuppressive Domain to Improve a Canarypox Virus-Vectored FeLV Vaccine. JVI. 2014; 88(2): 992-1001.
19. Zuckerman , E. Current Feline Leukemia Virus Research Supports: Confirm all in-hospital FeLV ELISA Positive Test by IFA. NVL. 2006; 5(4): 1-2.
20. Rand, J. Problem-based Feline Medicine. Australia : Elsevier ; 2006.
21. Norworthy, G. El paciente felino. Argentina : Intermédica; 2009.
22. Aybar, V. MANUAL PRÁCTICO Enfermedades infecciosas felinas. España : Servet; 2015.
23. Hartmann, K. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. Viruses. 2012;(4): 2684-2710.
24. Harvey, A. Manual de Medicina Felina. España: Lexus; 2014.
25. Muñoz, P. Manual Clínico del Perro y el Gato. España: Elsevier; 2015.
26. Gleich, S, Hartmann, K. Hematology and Serum Biochemistry of Feline Immunodeficiency Virus-Infected and Feline Leukemia Virus-Infected Cats. Vet Intern Med.2009; (23): 552-558.
27. Sturgess, K. Notas de Medicina Interna Felina. España : Acribia; 2006.
28. Quigley, J, Burns, C, Anderson, M, Lynch, E. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C, a retrovirus that induces red cell aplasia. Blood journal. 2000; 95(3): 1093-1099.

29. Moreno, R. Uso de la técnica de Inmuno Dot para el diagnóstico de anticuerpos contra el virus de Leucemia Viral Felina (FeLV) como prueba tamiz. Estado de México : Tesis de Licenciatura; 2014.
30. Lutz, H. Feline retroviruses, a brief review. Veterinary Microbiology. 1990; 23(1-4): 131-146.
31. Lutz, H, Pedersen, N, Higgins, J, Hübscher, U, Troy, F. Humoral immune reactivity to Feline leukemia virus and associated antigens in cats naturally infected with feline leukemia virus. AACR. 1980; 40(10): 3642-3651.
32. Kapil, S, Yeary, T, Jonhson, B. Investigación diagnóstica de virus emergentes en animales de compañía. Vet Clin Small Animal. 2008; 38(1): 755-774.
33. Guzmán, E. Las pruebas de ELISA. Gac Méd Méx. 2004; 140(3): 48-49.
34. Poffo, D, Almeida, A, Nakazato, L, Dutra, V. Feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukemia virus (FeLV) and Leishmania sp in domestic cats in the Midwest of Brazil. Pesq Vet Bras. 2017; 37(5): 491-494.
35. Hartmann, K. Role of Retroviruses in Feline Lymphoma. EJCAP. 2015; 25(3): 30-41.
36. Marín, J. Farmacología Práctica en Gatos. México : CEAMVET; 2016.
37. Zagal, N. Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina (Estudio preliminar). Estado de México : Tesis de Licenciatura; 2011.
38. Feline Leukaemia Virus-p27 Antigen (EIA-2469) Version 7.0. Alemania : DRG Instruments GmbH, 2016
39. Levy, J, Crawford, C, Hartmann, K, Hofmann-lehmann, R, Little, S. Feline Retrovirus Management Guidelines. USA: American Association of Feline Practitioners; 2008.
40. Levy, J, Burling, A. Feline Leukemia Virus and Related Diseases in Cats – Overview. USA: MSD Veterinary Manual;2016.
41. Boenzil, E, Hadron, M, Hartnack, S. Detection of Antibodies to the Feline Leukemia Virus (FeLV) Transmembrane Protein p15E: an Alternative Approach for Serological FeLV Detection Based on Antibodies to p15E. ASM. 2014; 52(6): 2046-2052.

42. Liu, J, O'connor, T, Beall, M. Evaluation of rapid diagnostic test kits for feline leukemia virus infection using samples from naturally infected cats. *Feline Medicine and Surgery.* 2016; 2(2): 1-4.
43. Minovich, F. MEDICINA FELINA PRÁCTICA II. Argentina : Aniwa; 2004.
44. Barr, M. FIV, FeLV and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Semin Vet Med Surg.* 1996; 11(3): 53-144.
45. Gutierrez, J. Inmunología Veterinaria. Mexico : El Manual Moderno; 2010.
46. Godorezky, C. Manual de Técnicas XIII. Curso Teórico Práctico de Genética Molecular. México : Depto de Inmunogenética de INDRE, Sector Salud; 1998.
47. Munro, H, Berghuis, L, Lang, S, Rogers, L. Seroprevalence of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) in shelter cats on the island of Newfoundland, Canada. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 2014; 78(1): 140-144.
48. Hofmann-lehmann, R, Cattori, V, Tandon, R, Boretti, F. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2008; 123(1): 119-123.
49. Helfer-hungerbuehler, K, Spiri, A, Riond, B, Grest, P. No benefit of therapeutic vaccination in clinically healthy cats persistently infected with feline leukemia virus. *Vaccine.* 2015; 33(1): 1578-1585.
50. Ramírez, H, Autran, M, Garcia, M, Carmona, A, Rodríguez, C. Genotyping of feline leukemia virus in Mexican housecats. *Arch Virol.* 2016;161(1): 1039-1045.
51. Little, S. 2017. Conferencia en el Congreso Veterinario de León. 7 Septiembre.